动 物 学 研 究 2001, Dec. 22 (6): 502～506
Zoological Research
CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853

简报

团头鲂胰岛素样生长因子-Ⅰ基因克隆与分析

白俊杰[①] 劳海华 叶 星 李英华 罗建仁
(中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室 广州 510380)

摘要：胰岛素样生长因子-Ⅰ (IGF-Ⅰ) 是一单链多肽。在脊椎动物中，IGF-Ⅰ通过介导生长激素达到促进生长的作用。为研究鲤科鱼类IGF-Ⅰ的结构功能及在水产养殖中的潜在应用前景，采用逆转录－聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法，从团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肝脏的总RNA中扩增出IGF-Ⅰ cDNA。测定了该基因序列，推导其编码的蛋白质序列。克隆的cDNA序列编码包括信号肽和B、C、A、D、E 6个区域的161个氨基酸。E区域分析结果表明所克隆的团头鲂IGF-Ⅰ序列属于IGF-Ⅰ Ea－2亚型。

关键词：团头鲂；胰岛素样生长因子－Ⅰ；基因克隆
中图分类号：Q959.46⁺.8，Q71；**文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)06－0502－05

胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin-like growth factor-Ⅰ, IGF-Ⅰ)是一单链多肽，因其结构与胰岛素原相类似而得名。在脊椎动物中IGF-Ⅰ通过介导生长激素达到促进生长的作用。IGF-Ⅰ前肽由信号肽和B、C、A、D、E 6个区域构成。形成成熟肽时，信号肽和E区域被切除。1989年Cao & Duguay首次从鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)中克隆到鱼类IGF-Ⅰ cDNA，推测出鲑的IGF-Ⅰ前肽由176个氨基酸组成，其中包括44个氨基酸的信号肽、70个氨基酸的成熟肽和62个氨基酸的E区域。此后，虹鳟(*Salmo rgairdnei*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambica*)、鲶(*Clarias macrocephalus*)、鲷(*Sparus aurata*)和鲨鱼(*Squalus acanthias*)等的IGF-Ⅰ基因和氨基酸序列相继得以研究。其研究表明，鱼类IGF-Ⅰ同源性很强，在整个进化过程中比较保守。此外，鱼类IGF-Ⅰ功能研究结果表明，IGF-Ⅰ能调节鱼体的渗透能力(McCormick *et al*., 1991)，是鱼类适应海水环境，调节渗透功能的内分泌介质。哺乳类IGF-Ⅰ能刺激鲑的生长(McCormick *et al*., 1992)；用重组罗非鱼IGF-Ⅰ注射鱼体可促进罗非鱼生长(Chen *et al*., 2000)。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)又名武昌鱼，是我国主要的养殖品种之一，为了探明其IGF-Ⅰ的结构与功能，研究IGF-Ⅰ在水产养殖业中的潜在应用价值，笔者克隆了团头鲂IGF-Ⅰ基因，并把推导的氨基酸序列与其他脊椎动物的IGF-Ⅰ进行了同源性比较。

1 材料和方法

1.1 材 料

约500 g团头鲂取自珠江水产研究所所水产良种基地。限制性内切酶、T_4 DNA连接酶及有关试剂购自Promega公司或华美生物工程公司。RNA提取试剂盒High Pure RNA Isolation Kit和逆转录试剂盒Access RT-PCR System分别为ROCH和Promega公司产品。大肠杆菌DH5α和质粒pUC18由本实验室保存。

1.2 RNA提取

取约10 mg团头鲂肝脏组织，用ROCH公司High Pure Tissue RNA Isolation Kit介绍的方法提取总RNA，电泳分析RNA质量。

1.3 引物设计与RT-PCR

参考鲑、鲤及哺乳动物IGF-Ⅰ基因阅读框的

收稿日期：2001－02－19；修改稿收到日期：2001－03－20
基金项目：农业部"九五"重点渔业科技资助项目（渔95－B－96－02－08－02)；中国水产科学研究院重点基金资助项目(99－08－02)
①通讯作者，E-mail: jjbai@163.net. Tel: 020－81510127

保守区域设计并合成5′和3′端引物：5′端引物为5′CGGAATTCATGTCTAGCGGACATT 3′。3′端引物为5′CGCGGATCCTTACTAAATGCGATAGTTT 3′。5′端引物拟从鱼IGF-Ⅰ信号肽第1个氨基酸的密码子ATG开始扩增，3′端引物拟从IGF-Ⅰ基因的终止密码子TAG开始反向扩增。为了方便克隆，在5′端引物和3′端引物中分别加入1个*Eco* RⅠ和1个*Bam* HⅠ酶切位点。按逆转录试剂盒Access RT-PCR System介绍的方法进行cDNA合成和PCR扩增。用逆转录酶48℃ 45 min合成cDNA第1条链，然后进行PCR扩增。前10个循环PCR反应条件为变性94℃30 s；退火50℃30 s；延伸68℃45 s。后25个循环PCR条件为变性94℃30 s；退火55℃45 s；延伸68℃1 min，循环结束后72℃延伸7 min。取5 μL PCR产物作1%琼脂糖凝胶电泳，PCR产物在约500 bp处应有一扩增带。

1.4 克隆与测序

PCR产物纯化后，用*Eco* RⅠ和*Bam* HⅠ双酶切，回收长度约500 bp DNA片段。同时用*Eco* RⅠ和*Bam* HⅠ将pUC18双酶切，在T_4 DNA连接酶作用下，将回收的DNA片段定向插入pUC18，构建pUCgIGF-Ⅰ重组质粒。转化感受态大肠杆菌DH5α，用蓝白斑和电泳酶切法筛选重组子。DNA测序在ABI PRISM™377全自动萤光测序仪上进行，用DNA分析软件vector NTI suite 6.0分析测定结果，并绘制几种脊椎动物IGF-Ⅰ氨基酸序列的系统发生树。

2 结　果

2.1 团头鲂IGF-Ⅰ基因的克隆与测序

用5′端引物和3′端引物扩增的PCR产物纯化后经*Eco* RⅠ和*Bam* HⅠ酶切，定向插入同样双酶切的质粒pUC18中，筛选得到5个重组子，经*Eco* RⅠ和*Bam* HⅠ酶切鉴定，均有约500 bp的插入片段。取其中pUCgIGF5和pUCgIGF8进行序列测定，测序结果和推测的氨基酸序列见图1。克隆到的目的基因片段共486 bp，编码整个阅读框的161个氨基酸和1个终止密码，即从团头鲂IGF-Ⅰ信号肽第1个氨基酸的密码子ATG到终止密码子TAG。所克隆的基因序列已登录入GenBank基因库，序号为AF332865。

2.2 序列分析

根据对人和其他脊椎动物的IGF-Ⅰ结构的分析，将克隆的团头鲂IGF-Ⅰ基因所推测的氨基酸序列分为信号肽和B、C、A、D、E 6个区域。各区域氨基酸序列数分别为：信号肽44个，B区29个，C区12个，A区21个，D区8个和E区47个。成熟肽B、C、A、D 4个区域共有6个胱氨酸残基。

3 讨　论

为研究我国主要的养殖鱼类IGF-Ⅰ的生理生化特性，笔者采用RT-PCR技术首次成功地克隆到团头鲂IGF-Ⅰ cDNA基因，从该基因的核酸序列推断出IGF-Ⅰ蛋白质的一级结构。将团头鲂IGF-Ⅰ的基因序列与亲缘关系较近的鲤IGF-Ⅰ基因序列进行比较，发现2种鱼在信号肽、B、C、A、D、E 6个区域中核酸具有很高的同源性，达93.8%。笔者把团头鲂IGF-Ⅰ成熟肽与鲤(*C. carpio*)(Liang *et al*., 1996)、鲑(*O. tshawytscha*)(Wallis & Devlin, 1993)、鲶(McRory & Sherwood, 1994)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)(Schmid *et al*., 1999)、鲷(*S. aurata*)(Duguay *et al*., 1996)、大杜父鱼(*Cottus scorpius*)(Loffing-Cueni *et al*., 1998)、鲨(*S. acanthia*)(Duguay *et al*., 1995)等几种鱼类和蛙(*Xenopus laevis*)(Kajimoto & Rotwein, 1990)、鸡(Kajimoto & Rotwein, 1991)、大鼠(Roberts *et al*., 1987)等脊椎动物及人(Rinderknecht & Humbel, 1987)的IGF-Ⅰ氨基酸序列进行了比较(图2)。其结果表明团头鲂IGF-Ⅰ与鲤仅在D区有1个氨基酸残基的差别；与人和鼠类等的同源性在74%以上，且差异主要集中在C和D区上，B和A区的同源性较高，在80%以上。在比较的12种动物中都含有定位相同的6个胱氨酸残基，这对于确定蛋白质构象是必要的。团头鲂IGF-Ⅰ与几种不同脊椎动物的氨基酸序列比较结果(图2)，和用vector NTI suite 6.0软件绘制的12种脊椎动物IGF-Ⅰ氨基酸序列的系统发生树(图3)，都基本体现了他们的系统分类地位，即团头鲂IGF-Ⅰ与同属于鲤科的鲤的同源性最高，与鲑科的鲑、丽鱼科的罗非鱼等的同源性次之，与哺乳类的人和鼠类的同源性较低。但与软骨鱼类鲨鱼的IGF-Ⅰ同源性较差，仅为68.6%。特别是团头鲂的IGF-Ⅰ D区的氨基酸序列与鲨鱼完全不同。而鲨鱼与其他脊椎动物IGF-Ⅰ的同源性也较低，其原因有待进一步探讨。

在研究鲑鳟鱼类IGF-Ⅰ时，发现存在4种IGF-Ⅰ

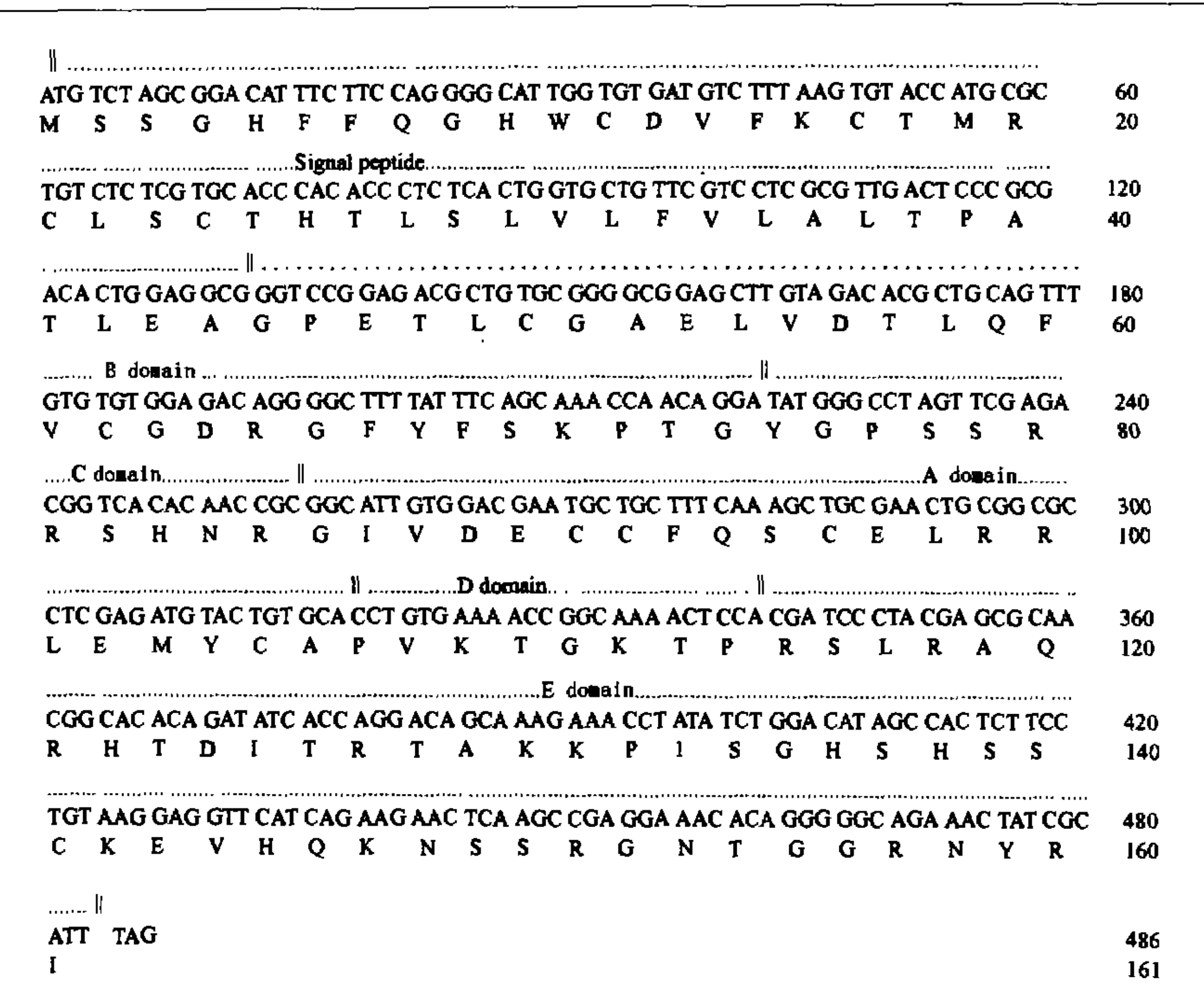


图 1 团头鲂 IGF-Ⅰ cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of bluntnose bream IGF-Ⅰ cDNA and predicted amino acid sequence

	B区 (B domain)	C区 (C domain)	A区 (A domain)	D区 (D domain)
团头鲂 (bluntnose bream)	GPETLCGAELVDTLQFVCGDRGFYFSKPT	GYGPSSRRSHNR	GIVDECCFQSCELRRLEMYCA	.PVKTGKTP
鲤 (common carp)	-----------------------------	------------	---------------------	.---P----
鲑 (salmon)	-------------------E---------	------------	---------------------	.---S--AA
鲶 (cat fish)	-------------------E-RVH-----	------------	---------------------	---S--AA
罗非鱼 (tilapia)	-------------------E-----N---	-----A---..-	-------------Q-------	.----P-IS
鲷 (sea bream)	S------------------E--------.	----NA---..-	---------------------	.-A--S-AA
大杜父鱼 (scorpius)	-------------------E--------Q	----NA---..-	---------------------	.-P--S-AA
鲨 (shark)	S-----------A------------N--A	--RS-V--P-Q-	---N-------D-KL------	K-CRADGPA
蛙 (frog)	-----------------------------	---SNN----H-	-----------DF--------	.-A-PA-SA
鸡 (chicken)	------------A----------------	---S----L-HK	-----------D---------	.-I-PP-SA
大鼠 (rat)	------------A------P-----N---	---S-I--APQT	--------R--D--------V	.RC-PT-SA
人 (human)	------------A------------N---	---S----APQT	--------R--D--------V	-L-PA-SA

图 2 团头鲂与 11 种不同脊椎动物的 IGF-Ⅰ氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of amino acid sequences of IGF-Ⅰ in bluntnose bream and 11 vertebrates

- 表示与团头鲂 IGF-Ⅰ相同的氨基酸 (indicate the amino acid is the same as that of bluntnose bream IGF-Ⅰ); ·表示缺失的氨基酸 (indicate the amino acid is lack)。

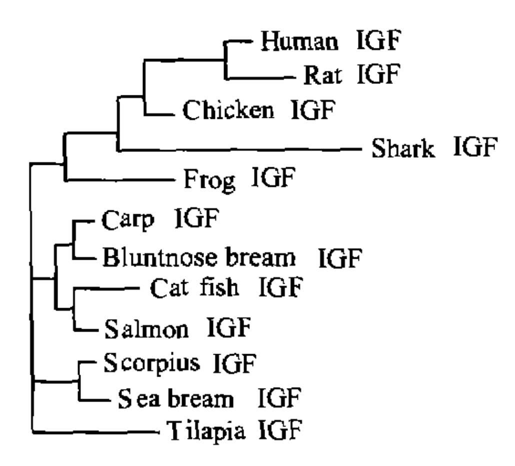


图 3　团头鲂和 11 种脊椎动物 IGF-Ⅰ氨基酸序列的系统发生树

Fig.3　Phylogenetic tree inferred from bluntnose bream and 11 vertebrates IGF-Ⅰ amino acid sequences

mRNA(Shamblott & Chen,1993),依其分子量大小分别命名为 Ea－1、Ea－2、Ea－3 和 Ea－4。这些转录产物都含有相同的信号肽和 B、C、A、D 区域,仅仅在 E 区域有所不同,其原因是该区域在转录后有不同的剪接方式。Ea－1、Ea－2、Ea－3 和 Ea－4 的 E 区域分别含有 35、47、62 和 74 个氨基酸。通过与虹鳟这 4 种 IGF-Ⅰ序列比较,本文所报道的团头鲂 IGF-Ⅰ序列应属于 IGF-Ⅰ Ea－2 亚型。Liang *et al*.,(1996)对鲤鱼成鱼肝 cDNA 进行检测后认为,IGF-Ⅰ Ea－2 是鲤鱼成鱼肝脏表达的主要形式。团头鲂是否也如此,还有待深入研究。

参 考 文 献

Cao Q P, Duguay S J, Plisetskaya E M *et al*, 1989. Nucleotide sequence and growth hormone-egulated expression of salmon insulin-like growth factor Ⅰ mRNA[J]. *Mol. Endocrinol*., 3:2005－2010.

Duguay S J, Chan S J, Mommsen T P *et al*, 1995. Divergence of insulin-like growth factor Ⅰ and Ⅱ in the elasmobranch, *Squalus acanthias* [J]. *FEBS Letters*, 371:69－72.

Duguay S J, Jin L Z, Steiner D F *et al*, 1996. Developmental and tissue regulated expression of insulin-like growth factor Ⅰ and Ⅱ mRNA in *Sparus aurata*[J]. *J. Mol. Endocrinol*., 16:123－132.

Chen J Y, Chen J C, Chang C Y *et al*, 2000. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-Ⅰ and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. *Aquaculture*, 181:347－360.

Kajimoto Y, Rotwein P, 1990. Evolution of insulin-like growth factor Ⅰ (IGF-Ⅰ): structure and expression of an IGF- precursor from *Xenopus laevis*[J]. *Mol. Endocrinol*., 4:217－226.

Kajimoto Y, Rotwein P, 1991. Structure of the chicken insulin-like growth factor Ⅰ gene reveals conserved promoter elements[J]. *J. Biol. Chem*., 266:9724－9731.

Liang Y H, Cheng C H, Chen K M, 1996. Insulin-like growth factor ⅠEa2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp(*Cyprinus carpio*)[J]. *Mol. Marine Biol. Biotechnol*., 5(2):145－152.

Loffing-Cueni D, Schmid A C, Graf H *et al*, 1998. IGF-Ⅰ in the bony fish *Cottus scorpius*: cDNA, expression and differential localization in brain and islets[J]. *Mol. Cell Endocrinol*., 141(1－2):187－194.

McCormick S D, Sakamoto T, Hasegawa S *et al*, 1991. Osmoregulatory actions of insulin-like growth factor-Ⅰ in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *J. Endocrinol*., 130:87－92.

McCormick S D, Kelley K M, Young G *et al*, 1992. Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor Ⅰ [J]. *Gen. Comp. Endocrinol*., 86:398－406.

McRory J E, Sherwood N M, 1994. Catfish express two forms of insulin-like growth factor-Ⅰ(IGF-Ⅰ) in the brain: Ubiquitous IGF-Ⅰ and brain-specific IGF-Ⅰ [J]. *J. Biol. Chem*., 269(28):18588－18592.

Rinderknecht E, Humbel R E, 1987. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor Ⅰ and its structure homology with proinsulin[J]. *J. Biol. Chem*., 8:2769－2776.

Roberts C T Jr, Lasky S R, Lowe W L *et al*, 1987. Rat IGF-Ⅰ cDNAs contain multiple 5′-untranslated regions[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 146:1154－1159.

Schmid A C, Nef E, Kloas W *et al*, 1999. Insulin-like growth factor Ⅰ + Ⅱ in the ovary of the bony fish *Oreochromis mossambicus*: localization, expression, cDNA sequence[J]. *Mol. Cell Endocrinol*, 156:141－149.

Shamblott M J, Chen T T, 1993. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost[J] *Mol. Mar. Biotechnol*., 2:351－361.

Wallis A E, Devlin R H, 1993. Duplicate insulin-like growth factor-Ⅰ genes in salmon display alternative splicing pathways[J]. *Mol. Endocrinol*., 7(3):409－422.

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Insulin-like Growth Factor-Ⅰ cDNA from Bluntnose Bream (*Megalobrama amblycephala*)

BAI Jun-Jie LAO Hai-Hua YE Xing LI Ying-Hua LUO Jian-Ren

(*Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Lab. of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou* 510380, *China* *jjbai@163.net*)

Abstract: Insulin-like growth factor-Ⅰ (IGF-Ⅰ) is a single-chain polypeptide with structural homolog to proinsulin. It plays an important role in regulating somatic growth in vertebrates via growth hormone. To study fish IGF-Ⅰ's structure, function and it's potential application in aquaculture, we cloned the insulin-like growth factor-Ⅰ cDNA from bluntnose bream (*Megalobrama amblycephala*). Total RNA was isolated from liver tissue. The cDNA encoding IGF-Ⅰ peptide was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) strategy using isolated total RNA as template. The amplified cDNA fragment was inserted to vector pUC18. The cloned cDNA was sequenced and the amino acid sequence of bluntnose bream IGF-Ⅰ was predicted. The nucleotide sequence showed that the cDNA encode 161 amino acids including signal peptide and B, C, A, D, E six domains. Analysis of E domain indicates that the cloned bluntnose bream IGF-Ⅰ cDNA belongs to IGF-Ⅰ Ea-2 subtype.

Key words: Bluntnose bream; Insulin-like growth factor Ⅰ; Molecular cloning

书 讯

新书《克隆园》简介

这是一本科幻童话故事。《克隆园》以科普、科幻童话的形式重点介绍了当今世界最为关注的科技热点——“生物克隆”。并详细描述了一些世界濒危动物的生活习性，强调了保护地球生态环境的重要性。

书中叙述了一只身怀绝技——哭就能让周围人大笑不止的，名字叫做“小鼠王”的小老鼠在寻找妈妈的路途中意外地闯入克隆园的奇遇。克隆园由两个园组成：善良正义的乐园和邪恶荒诞的恶园。小鼠王在乐园里认识了很多珍稀动物，有大熊猫、亚洲象、长臂猿、考拉、白鳍豚，还有能制造生物药品的转基因牛等等。在乐园为增强市民的环保意识而举办的“信息杯清洁大赛”上，小鼠王和考拉力夺冠军。从信息杯中小鼠王得知妈妈的下落，并获得奖品“心灵探测感应器”。凭借这个探测器小鼠王只身闯入险恶的恶园，历经艰险后找到身陷囹圄的妈妈，并协助乐园向恶园开战。乐园的新、老市民一起协同作战，机智地消灭了恶园的魔鬼，最终战胜了邪恶势力。

狭义地讲，童话是为孩子们写的。但《克隆园》对孩子的父母来说也值得一读。该作品在叙述了人类对生命的认识和控制的同时，也叙述了这种认识和控制可能给人类社会带来的潜在危机。这种危机不仅仅是孩子、孩子的父母应该了解的，而且也是每一位现在和未来的科学家、科学研究的决策者应该认识和思考的。

一本好的科普、科幻读物可以影响一代乃至几代人的成长。在新世纪到来之际，《克隆园》有幸诞生了。愿这部作品能够给未来的科学家，以及不仅仅局限于孩子们的广大读者带来有益的启迪。

《克隆园》作者：王建红，笔名：慕如。由重庆出版社于 2001 年 4 月出版。

王建红

(中国科学院昆明动物研究所 650223)